

Tricellulin expressziója humán pancreasban és májban, illetve ezek primer daganataiban

Doktori tézisek

Dr. Korompay Anna

Semmelweis Egyetem
Patológiai tudományok Doktori Iskola



Témavezetők: Dr. Schaff Zsuzsa, az MTA levelező tagja, professor emerita
Dr. Kiss András, PhD, egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Végső Gyula PhD, egyetemi adjunktus
Dr. Szmola Richárd PhD, főorvos

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Sági Zoltán DSc, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Simon Károly PhD, osztályvezető főorvos

Dr. Bodánszky Hedvig, PhD, egyetemi magántanár

Budapest
2016

1. BEVEZETÉS

A hasnyálmirigy ductalis adenocarcinomái az exocrin pancreas tumorainak közel 90%-át alkotják, a fennmaradó 10% cysticus eredetű tumor. A betegségcsoportra jellemző az anatómiai elhelyezkedésből és a későn jelentkező tünetekből adódóan a nehéz diagnosztika, a szerény kezelési lehetőségek és a kifejezetten rossz prognózis: a diagnózis után egy évvel a betegek közel 90%-át elveszítjük; a túlélők csak az operált populációból kerülnek ki. Ötéves túlélése nem éri el a 7%-ot. A pancreas Langerhans-szigeteinek sejtjeiből kiinduló funkcionáló vagy nem funkcionáló daganatok lényegesen ritkábban fordulnak elő az exocrin daganatokhoz képest; az összes pancreastumor 1-2%-a tartozik ebbe a szövettani típusba. Míg a ductalis adenocarcinomák jellemzője az 'adenoma-carcinoma'-progressziós modell, melyet speciális genetikai eltérések is kísérnek, az endocrin hasnyálmirigy-daganatok nem mutatnak szekvenciális kialakulást. Az endocrin hasnyálmirigy-daganatok túlélése lényegesen jobb, mint az exocrin tumoroké; a sebészileg kezelt, jól differenciált daganatok 5 éves túlélése meghaladja a 60%-ot. Az acinussejtes carcinomák a hasnyálmirigy-daganatok 1-2%-át képviselik. Neuroendocrin eredetüket igazolja a diagnosztika során alkalmazott chromogranin-, synaptophysin- és neuron-specifikus enoláz termelő képesség, az exocrin differenciációt támasztja alá a daganatok acinusképző természete. Agresszív, rossz prognózisú tumorok, metastasisképző potenciáljuk nagy, korán adnak áttétet a májba. Terápiájuk gyakorlatilag csak sebészi; a recurrens vagy inoperabilis esetekben alkalmazott kezelési lehetőségek igen szerények.

A hepatocellularis carcinoma (HCC) a leggyakoribb primer malignus májdaganat. Etiológiájában számos veleszületett és szerzett tényező szerepet játszik; leggyakrabban a májcirrhosis, a hepatotrop vírusok (HBV, HCV) által okozott krónikus májgyulladások, a túlzott alkoholfogyasztás, az aflatoxin-expozíció és különböző tárolási betegségek fokozzák kialakulásának lehetőségét. Túlnyomórészt cirrhosis talaján alakul ki. A daganat a terápiás lehetőségek bővülése ellenére is rossz prognózisú, 5 éves túlélése 15–20% között alakul. A fibrolamellaris HCC (FLHCC) a HCC ritka variánsa; leginkább fiatal korosztályban alakul ki, cirrhosismentes májban. Etiológiája ismeretlen; a klasszikus májsejtdaganatok esetében ismert rizikófaktorok e daganattípus kialakulása során nem játszanak érdemi szerepet. Eddig egyetlen ismert rizikófaktora a focalis nodularis hyperplasia (FNH). Korai, a lehetőségekhez mérten célzott terápia mellett prognózisa lényegesen jobb a HCC-csoportéhoz képest, öt éves túlélése a 30%-ot is meghaladja – ehhez feltehetően a betegek fiatalabb életkora és az

egyébként 'egészséges' májszövet is hozzájárul. A cholangiocarcinomáknak (CC) kiindulási helyüktől függően extra- és intrahepatikus típusa ismert, az intrahepatikus cholangiocarcinoma incidenciája napjainkban egyértelműen emelkedik. Etiológiája nincs pontosan tisztázva; ismert rizikófaktorai a primer sclerotizáló cholangitis, policystás májbetegség, egyes parazita-fertőzések (májmétely), epekövesség, illetve számos mérgező anyag. Az R0-rezekción átesett betegek közel 30%-a 5 év után is él, az összes diagnosztizált CC esetében a betegek 5 éves túlélése nem haladja meg a 20%-ot. Az átlagos túlélési idő 15–28 hónap.

A tight junction az epithelialis és endothelialis sejtek apicalis részén elhelyezkedő multiprotein membránkomplex. Fő feladata a két, egymás szomszédságában lévő sejt között folyó paracellularis transzportfolyamatok és a permeabilitás szabályozása, illetve számos egyéb cellularis mechanizmusban is fontos szerepet tölt be. További feladata a sejtek polaritásának létrehozása és megőrzése, melyet ezen sejtkapcsoló struktúra az apicalis és basolateralis sejtfelszín közötti laterális diffúzió, illetve az apicalis membránon végbemenő receptormediált endocytosis és a basolateralis membránon keresztül zajló exocytosis szabályozásával ér el. Lényeges feladata van a sejt-extracellularis mátrix közötti ozmotikus egyensúly fenntartásában is. A TJ-fehérjék egy része szerepet játszik a sejtproliferáció és egyes szignáltranszdukciós útvonalak szabályozásában, mások a carcinogenesisben, illetve további proteinek fontos funkciót töltenek be a metastasisképzésben és a tumorprogresszióban. A TJ-nak további lényeges szerepe van az epithelialis-mesenchymalis átalakulás mechanizmusában is, mely mind fiziológiás körülmények, mind patológiás viszonyok között megfigyelhető jelenség. Felépítésüket tekintve integráns és cytoplasmaticus fehérjékből épülnek fel. A ZO-fehérjék fontos feladatot látnak el nemcsak a TJ felépítésében, hanem a sejtkapcsoló struktúra fenntartásában is: ismert, hogy e proteincsalád hiánya következtében a hámsejtek nem képesek működőképes TJ létrehozására. Az occludin overexpressziója emeli a sejtmembrán elektromos ellenállását (barrier-funkció). Sejtproliferációban betöltött szerepe sokáig kérdéses volt, a közelmúltban azonban igazolták jelenlétét a centrosomákban, amelyekben feltehetően egy foszforilációs útvonalon keresztül, a centrosoma-szeparáció révén befolyásolja a mitosist. A claudinok (CLDN) közül az elsőket 1998-ban fedezték fel; az eddig leírt közel harminc altípus közül lokalizáció és funkció tekintetében számos sejt- és szövetspecifikusságot mutat. Filogenetikai osztályozás alapján két nagy csoportba, az ún. 'klasszikus CLDN' és a 'nem klasszikus CLDN'-kategóriába

illeszthetők. Közös feladatuk az intercellularis rések lezárásában és a sejtadhesióban való részvétel, a paracellularis transzportfolyamatok szabályozása és a lateralis diffúzió szabályozásán keresztül a szöveti homeosztázis biztosítása. Ismert tény az is, hogy a CLDN-3 és -4 a *Clostridium perfringens* enterotoxinjának (CPE) receptora: kötődése után a toxin hatására a CLDN-molekula depolimerizálódik, az így létrejövő pórusokon keresztül fokozódik a membránpermeabilitás. E citotoxikus mechanizmust kihasználva napjainkban a CPE-receptor és a claudinok kapcsolata a rosszindulatú daganatok célzott terápiájával kapcsolatos kutatások kiemelt eleme. A normál humán pancreas CLDN-expresszió vizsgálata alapján a ductalis sejtek CLDN-1, -2, -3, -4 és -7 fehérje pozitívak, az acinussejtek CLDN-1, -3, -4 és -7 fehérjét expresszálnak, míg az endocrin hasnyálmirigy CLDN-3 és -7 proteint termel. Az exocrin eredetű, ductalis adenocarcinomák túltermelik a CLDN-1, -2, -4 és -7-t, míg az endocrin pancreastumorok esetében csak CLDN-3 és -7 pozitívítás észlelhető. A normál májszövetet vizsgálva egyértelmű, linearis CLDN-1 és CLDN-7 membránpozitívitas észlelhető mind a hepatocyták, mind az epeúti sejtek apicalis felszínén. A CLDN-2 fehérje a citoplazmában, granularisan mutatható ki. A CLDN-3 a hepatocyták membránjában gyengén expresszálódik, míg az epeutakban egyértelmű, lényegesen erőteljesebb mértékben mutatható ki. CLDN-4 fehérje csak a biliaris sejtekben azonosítható.

A barriológia aktuális kutatási eredményei alapján a hámsejtek közötti szoros sejtkapcsoló struktúráknak jelenleg két formáját különböztethetjük meg; ezek a két sejtet összekapcsoló bicellularis TJ-k és a három sejt találkozási pontjában észlelhető tricellularis TJ-k. Míg a két hámsejt közötti szoros sejtkapcsolat létrehozásában szerepet játszó bicellularis junctiók létezése már régóta ismert és az ezeket alkotó fehérjék túlnyomó többségét is azonosították, a három sejt találkozási pontjánál elhelyezkedő sejtkapcsoló struktúrákat alig néhány éve fedezték fel. A 63,6 kDa molsúlyú, 555 aminosavból felépülő tricellulin (TRIC) protein négy transzmembrán domainnel, két extracelluláris hurokkal és intracelluláris terminalisokkal rendelkezik, 4 izoformája ismert. Bár funkciója még nincs tisztázva teljes egészében, számos feladatára már fény derült; köztük az egyik legfontosabbra, a transepithelialis barrier fenntartására. Egyes vizsgálatok alapján a TRIC-expresszióban gátolt sejtekben a transepithelialis rezisztencia csökkenése és a paracellularis permeabilitás fokozódása is észlelhető. Az a tény, hogy a tricellularisTJ centralis tubulusának átmérője meghaladja számos gyógyszermolekula méretét, elősegítheti a TRIC jövődöbéli szerepét egyes gyógyszerhatóanyagok szállításában is.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Napjainkban világszerte aktív kutatások folynak a barriológia területén; számos eredménynek meghatározó következménye lehet klinikai vizsgálatok, esetleges jövődöbéli célzott terápiás lehetőségek tekintetében is. A TRIC-fehérje különböző, sejtdifferenciációban, carcinogenesisben, tumorprogresszióban eddig megismert szerepe nyomán került kutatásunk középpontjába. A fehérjével kapcsolatos vizsgálatok túlnyomórészt sejtvonalakon folytak. Humán hasnyálmirigyben és májban ezidáig a TRIC-protein jelenlétét nem vizsgálták. Mindezek alapján célul tűztük ki az alábbi kérdések megválaszolását:

- 2.1.** Expresszálódik-e a TRIC normál humán pancreasban? Amennyiben igen, az expresszió mértéke különbözik-e a ductalis, acinaris, illetve endocrin struktúrákban?
- 2.2.** Megfigyelhető-e a TRIC fehérje pancreas eredetű ductalis adenocarcinomákban?
- 2.3.** Észlelhető-e TRIC-expresszióbeli különbség a normál pancreas és a ductalis adenocarcinomák, illetve az eltérő differenciáltságú adenocarcinomák között?
- 2.4.** Kimutatható-e TRIC endocrin pancreasdaganatokban, s amennyiben igen, eltérően expresszálják-e a különböző grádusú endocrin tumorok ?
- 2.5.** Detektálható-e a TRIC a hasnyálmirigy acinussejtes carcinomájában?
- 2.6.** Jelen van-e normál humán májszövetben a TRIC? Amennyiben igen, észlelhető-e expressziós vagy lokalizációs különbség a májsejtek és az epeutak között?
- 2.7.** Kimutatható-e TRIC cirrhotikus, nem daganatos májszövetben?
- 2.8.** HCC-ban azonosítható-e a vizsgált molekula?
- 2.9.** Van-e különbség a különböző differenciáltságú HCC-k TRIC expressziójában?
- 2.10.** Előfordul-e a vizsgálni kívánt protein fibrolamellaris HCC-ben?
- 2.11.** Észlelhető-e a TRIC-fehérje termelődése cholangiocellularis carcinomában, illetve van-e expressziós különbség az eltérő differenciáltságú adenocarcinomák között?

3. ANYAG ÉS MÓDSZEREK

3.1. Betegek, vizsgálati anyagok

Vizsgálataink során összesen 128, a SE II.sz. Patológiai Intézet archívumából származó tumormintát, közülük 76 hasnyálmirigydaganatot és 52 primer májdaganatot, illetve 12 cirrhotikus mintát elemeztünk. A pancreastumorok közül 58 sebészileg eltávolított pancreas ductalis adenocarcinomát (14 grade 1, 19 grade 2 és 25 grade 3 daganat), 15 endocrin hasnyálmirigy tumort (5 benignus, 7 borderline és 3 malignus) és 3 acinussejtes carcinomát vizsgáltunk; a májtumorok közül 32 HCC-t (10 grade 1, 13 grade 2, 8 grade 3 és 1 kevert grádusú daganat) és 20 intrahepatikus cholangiocellularis carcinomát (5 grade 1, 9 grade 2 és 6 grade 3 differenciáltságú tumor) elemeztünk a Semmelweis Egyetem Etikai Bizottságának engedélyével (#172/2003). A májdaganatok vizsgálata mellett 12 cirrhotikus májszövetet is bevontunk kutatásunkba. Munkánk másik részében a HCC-k egy altípusát, a fibrolamellaris HCC-t vizsgáltuk; a kiválasztott 11 eset mellett 7 'konvencionális' és 7 cholangiocarcinomát is elemeztünk. Immunfluoreszcens vizsgálatainkat 5-5 ép hasnyálmirigy és ductalis adenocarcinoma, illetve normál máj és HCC frissen fagyasztott, -80°C-on tárolt mintáján végeztük. Kontrollcsoportjainkat 20, hasnyálmirigy tumor mellől vett, daganatmentes pancreaszövet, illetve 20 tumormentes májállomány alkotta.

3.2. Módszerek

3.2.1. Szövetteni vizsgálatok

A szövetmintákat az eltávolítás után azonnal 10%, pufferolt formalinba helyezve 24 órán keresztül szobahőmérsékleten fixáltuk. Ethanol- és xylol- dehidratációt követően paraffinba ágyasztuk. A 3-4 µm vastagságú metszeteket hematoxilinnal és eozinnal festettük meg (ReanalKft., Budapest, Magyarország). Az acinussejtes daganatok vizsgálatakor perjódsav-Schiff (PAS)- és emésztés-PAS-reakciót végeztünk, illetve mucikármin festést alkalmaztunk. A pontos diagnózis és grádus meghatározását három független patológus szakorvos végezte.

3.2.2. Immunfluoreszcencia

Immunfluoreszcens vizsgálataink során 5 normál hasnyálmirigy, 5 pancreas ductalis adenocarcinomát, illetve 5 normál májat, 5 HCC-t és 5 iCC-t elemeztünk. A fagyasztott

blokkokból származó, 5 µm vastagságú metszeteket metanol és aceton 1:1 arányú keverékében pancreas esetében 5, a májminták esetében 10 percig -20°C-on fixáltuk, majd szobahőmérsékleten megszárítottuk. A nem-specifikus fehérjekötődést PBS-oldattal (Protein Block Serum-Free; DAKO, Glostrup, Dánia) gátoltuk 30 percig 37°C-on. A metszeteket a primer antitestekkel 4°C-on, egy éjszakán át inkubáltuk.

Másodlagos antitestekként Alexa Fluor 568 kecskében termelt, nyúl-ellenes IgG-t (Invitrogen) és Alexa Fluor 488 számárban, egér ellen termelt IgG-t (Invitrogen) használtunk 1:200, PBS-hígításban (Phosphate Buffered Saline). Metszeteinket 30 percig szobahőmérsékleten, sötétben inkubáltuk, majd magfestésként 4',6-diamino-2 phenylindole (DAPI)-tartalmú Vectashieldet (Vector Labs., Burlingame, CA, USA) használtunk.

Kettős immunfluoreszcens vizsgálatainkat pancreaszövetekben tricellulin és occludin, tricellulin és synaptophysin, illetve tricellulin és kollagén IV kolokalizációjának kimutatása céljából végeztük. Májban tricellulin-CLDN-1 és – a tricellulin hámsejteken belüli orientációjának pontosítása céljából – tricellulin-MDR/MRP2 kettős jelölést végeztünk. HCC-ban a tricellulin-CLDN-1, míg intrahepatikus cholangiocarcinomákban a tricellulin-CLDN-4 ko-lokalizációját elemeztük. A fagyasztott metszeteket egy éjszakán át 4°C-on inkubáltuk a fent részletezett primer antitestekkel, ezt követően szekunder ellenanyagként szintén Alexa Fluor 568 jelölt, kecskében termelt, nyúl-ellenes IgG-t (Invitrogen) és Alexa Fluor 488 jelölt, számárban, egér ellen termelt IgG antitestet (Invitrogen) használtunk 1:200, PBS-hígításban (Phosphate Buffered Saline).

Az elvégzett immunreakciókat fluoreszcens mikroszkóp (Leica, RXA, Wetzlar, Németország) és konfokális lézer scanning mikroszkóp (Bio-Rad MRC-1024 system, Bio-Rad Lab., Hercules, CA, USA) segítségével, három független szakorvos részvételével elemeztük.

3.2.3. Immunhisztokémiai reakciók

A 3 µm vastagságú, formalinban fixált, paraffinba ágyazott metszeteket xilolban deparaffináltuk és felszálló alkoholsorban rehidráltuk. Az epitópfeltárás céljából végzett 4 perces proteáz-1 emésztést követően (Ventana Tucson, AZ, USA) peroxidáz és fehérjeblokkolást végeztünk, majd mintáinkat 42°C-on, 40 percen keresztül inkubáltuk nyúlban termelt poliklonális TRIC anti-C-terminális antitesttel, 1:50 hígításban. A jelerősítéshez Amplification Kitet (Roche, Indianapolis, USA) használtunk. Az

immunhisztokémiai reakciókat HRP-alapú Ventana Benchmark XT (Ventana) immunfestő automatával végeztük a gyártó ajánlásának megfelelő protokoll szerint. A szekunder ellenanyagok alkalmazása után a reakciók láthatóvá tételéhez UltraView™ Universal DAB DetectionKitet (Ventana) alkalmaztunk.

Pozitív kontrollként hasnyálmirigy esetében a tricellulint ismerten expresszáló egér duodenumából származó metszeteket, májmintáinkhoz humán duodenumot használtunk; negatív kontrollmintáink elkészítése során a primer antitesteket 'Antibody diluent'-tel (Ventana) helyettesítettük.

3.2.4. A tricellulin immunhisztokémiai reakciók értékelése

A tricellulin immunhisztokémiai reakciók kvantitatív elemzéséhez a metszeteket Mirax Panoramic Midi, illetve Panoramic 250 Scanner (3D Histech, Budapest, Magyarország) segítségével digitalizáltuk. Esetenként tizenöt, pancreas esetében 40x, májmintáink során 60x nagyítású, véletlenszerűen kiválasztott, nem átfedő látóteret fotóztunk. Az immunpozitivitás mértékének meghatározását digitális morfometria segítségével (LeicaQwin Software; Leica, Wetzlar, Németország) végeztük.

Ennek során meghatároztuk a vizsgált látóter teljes pixelszámahoz viszonyítva a pozitív területek pixelszámát, majd a program ez alapján kiszámolta az immunpozitív terület százalékos arányát (Area %). A reakciók kiértékelésekor az esetenként vizsgált 15 látóter vizsgálatakor kapott értékeket átlagolva minden mintához átlag-terület (area) %-ot társítottunk. A pozitív területek százalékos arányát a teljes vizsgált területhez viszonyítva adtuk meg, ezt az értéket tekintettük 'Area %'-nak.

3.2.5. Statisztikai analízis

A statisztikai vizsgálatok során csoportjaink tricellulin-expressziójának mértékét vetettük össze, melyhez Mann-Whitney-féle non-parametrikus tesztet használtunk. A túlélési elemzések során Kaplan-Meier analízist végeztünk. A teljes túlélés (OS) intervallumának a diagnózistól a halál bekövetkeztéig tartó időszakot tekintettük. A túlélés, illetve a tricellulin-expresszió és egyéb változók közti összefüggést pancreas vizsgálataink során log-rank, májmintáink esetében Spearman-rank korrelációs teszttel elemeztük. A tricellulin-expresszió mértéke és a teljes túlélés közötti relatív kockázat felméréséhez univariációs Cox-regressziós analízist alkalmaztunk. Elemzéseink során a szignifikancia-határt $p < 0.05$ -ben határoztuk

meg. Statisztikai vizsgálatainkat a Statistica 7.0 szoftver (StatSoft Inc.,Tulsa, OK, USA) segítségével végeztük el.

3.2.6. Western-blot

Western-blot vizsgálatainkhoz 6-6 kontroll májból, HCC-ből és iCC-ből, illetve 5-5 normál pancreasból és pancreas ductalis adenocarcinomából származó fagyasztott szövetből végeztünk fehérje-izolációt. Ennek során 50-50 mg mintát folyékony nitrogénben porítottunk, majd centrifugálással (13 200 rpm, 4°C, 5 min), illetve lízis-pufferben (20 mM TRIS pH7.5, 150 mMNaCl, 2 mM EDTA, 1% TritonX-100 és proteáz-gátló koktél/SigmaAldrich, St Louis, MO, USA/) homogenizáltunk. A minták protein-koncentrációját Bradford-fehérje meghatározás segítségével határoztuk meg, majd gélelektroforézist végeztünk mintánként 30 µg mennyiségű lizátummal 10% SDS-poliakrilamid gélen, 35 percen keresztül, 200V feszültséggel futtatva. Ezt követően a fehérjemintákat 100V feszültség mellett 75 percen keresztül, 4°C-on nitrocellulóz membránra blottoltuk. A folyamat ellenőrzéséhez Ponceau-S vörös festést alkalmaztunk. Az aspecifikus fehérjekötődés kivédésére mintáinkat 5% zsírmentes tejben (Sigma) inkubáltuk szobahőmérséketen, 30 percig. Mindezek után a nitrocellulóz membránokat TRIS-pufferolt sóban (TBS) hígított primer tricellulin (nyúl poliklonális; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA 1:500) és GAPDH (egér monoklonális; AbDSerotec, Kidlington, UK; 1:5000) antitestekkel inkubáltuk 4°C-on egy éjszakán át. TBS-Tween (0.1% Tween 20) mosás után tormaperoxidáz (HRP)-konjugált másodlagos ellenanyagokat alkalmaztunk (nyúl- és egérellenes antitestek; Dako, Glostrup, Dánia) 1:2000 TBS-hígításban 2 órán keresztül, szobahőmérsékleten.

A folyamat végén az elkészült membránokat kemilumineszcens oldattal inkubáltuk (BioRad, Hercules, CA, USA), majd az immunreakciókat Kodak géldokumentációs rendszer (Kodak, Rochester, NY, USA) segítségével elemeztük.

3.2.7. RT-PCR

RNS-izolálás

mRNS-expressziós vizsgálatainkhoz 5 formalin-fixált, paraffinba ágyazott normál hasnyálmirigyszövetet, 10 grade 1, 11 grade 2 és 9 grade 3 pancreas ductalis adenocarcinomát választottunk ki.

Az RNeasy FFPE Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) segítségével teljes RNS-t izoláltunk öt-öt 5-10µm vastagságú, nekrozis-, vérzés- és kötőszövetmentes makrodisszekált metszetből. Az izolált RNS mennyiségét NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) spektrofotométer használatával mértük.

RNS reverz transzkripció

A vizsgálatokhoz szükséges DNS-t esetenként 1-1µg teljes RNS-ből, High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) alkalmazásával állítottuk elő.

Primertervezés

A realtime RT-PCR során alkalmazandó gén-specifikus primereket AlleleID 6.01 szoftverrel (Premier Biosoft International, CA, USA) terveztük meg. Az izoforma-specifititás és a tervezett primerek méretének meghatározásához BioEdit szekvencia-ellenőrző szoftvert (Tom Hall Ibis Therapeutics, Carlsbad, CA, USA) használtunk. A primerek specificitását BiSearch szoftverrel (MTA Enzimológiai Intézet, Budapest, Magyarország) ellenőriztük. Vizsgálataink során a primer-specifikus amplifikációs hőmérsékletet (58°C) gradiens-PCR segítségével optimalizáltuk.

PCR és Real-Time PCR

SYBR Green-alapú real-time RT-PCR vizsgálatainkat az ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) segítségével végeztük el a gyártó protokolljának megfelelően. Belső kontroll-génként a konstitutívan expresszáldó ABL-ab gént (Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1) használtuk. Az amplifikációra váró 20 µl reakcióelegy Power SYBR Green PCR Master Mix-et (Applied Biosystems), 10 pM forward és reverz primert és 100 ng cDNS-templátot tartalmazott. Az amplifikáció paraméterei a következők voltak: inkubáció 95°C-on 10 percig; majd 45 cikluson keresztül 95°C-on 15 másodpercig, 60°C-on 1 percig és 72°C-on 15 másodpercig. Az olvadáspont-analízis során 20 másodpercen át 95°C-os melegítést, 10 másodpercen keresztül 45°C-on végzett hűtést, majd 95°C-ra való újramelegítést végeztünk. A primer-specifikus amplifikációt 2% agaróz gélelektroforézissel és olvadáspont-analízissel ellenőriztük.

4. EREDMÉNYEK

4.1. „Expresszálódik-e a TRIC normál humán pancreasban? Amennyiben igen, az expresszió mértéke különbözik-e a ductalis, acinaris, illetve endocrin struktúrákban?”

Immunhisztokémiai vizsgálataink során egyértelmű TRIC-expressziót észleltünk az acinussejtekben, a ductulusokban és a nagyobb ductusokban is. A TRIC a ductus- és acinussejtek apicalis pólusához közeli tricelluláris találkozási pontoknak megfelelően pontszerűen helyezkedett el, míg lineáris membrán-pozitivitás mutatkozott a bicelluláris junkciók területén. A TRIC és occludin kettős immunfluoreszcens jelölése során a két fehérje együttes elhelyezkedését detektáltuk a ductus- és acinussejtek apicalis membránjában. Az általunk vizsgált endocrin pancreasterületek egyike sem mutatott TRIC-pozitivitást. Eredményeinket Western-blot segítségével is megerősítettük. Az anatómiai struktúráktól függő expressziós különbséget nem észleltünk.

4.2. „Megfigyelhető-e a TRIC fehérje pancreas eredetű ductalis adenocarcinomákban?”

Az általunk vizsgált grade 1, grade 2 és grade 3 differenciáltságú ductalis adenocarcinomákban a TRIC a daganatsejtek luminális membránjának megfelelően pontszerű elhelyezkedésben volt azonosítható.

4.3. „Észlelhető-e TRIC-expresszióbeli különbség a normál pancreas és a ductalis adenocarcinomák, illetve az eltérő differenciáltságú adenocarcinomák között?”

Az ép pancreashoz képest a jól differenciált daganatokban lényegesen kevésbé volt észlelhető lineáris immunpozitivitás. Vizsgálataink során a daganatok dedifferenciációjával párhuzamosan a TRIC expressziójának kifejezett csökkenését tapasztaltuk. A TRIC expressziója a vizsgált grade 2 tumorok körében szignifikánsan csökkent mind a normál pancreasban, mind pedig a grade 1 daganatokban észleltekhöz képest. A grade 3 adenocarcinomák szignifikánsan kevésbé expresszálták a TRIC-t a normál hasnyálmirigyszövetekhez és a grade 1 daganatokhoz és a grade 2 tumorokhoz képest is. A daganatok dedifferenciálódásával párhuzamosan csökkenő TRIC-expressziót Western-blot vizsgálattal is megerősítettük. Az elvégzett digitális morfológia alapján a TRIC

expressziójának szignifikáns csökkenését észleltük a grade2 ductalis adenocarcinomákban mind a normál, mind a grade 1 daganatokhoz képest. Ehhez hasonlóan szignifikáns expressziós különbséget tapasztaltunk a grade 3-s daganatcsoportban a normál pancreashoz és a grade 1, illetve a grade 2 adenocarcinomákhoz képest is.

Túlélési vizsgálatainkhoz log-rank analízist végeztünk, mely szignifikáns összefüggést mutatott a ductalis adenocarcinomák differenciáltsága és a betegség túlélése között. A TRIC-expresszió és a tumor kiérettiségének foka között észlelt szignifikáns összefüggések alapján pedig a vizsgált fehérje expressziója és a túlélés mértéke között indirekt korreláció valószínűsíthető. A differenciált, magas TRIC expressziót mutató hasnyálmirigyrákos betegek betegek tehát szignifikánsan jobb túlélést mutatnak a rosszul differenciált, alacsony TRIC-expressziójú daganatos betegekhez képest.

A TRIC-mRNS relatív expressziója kvantitatív valós idejű RT-PCR vizsgálataink alapján a normál hasnyálmirigyszövetben szignifikánsan magasabbnak bizonyult mind a grade 1 daganatokhoz, mind a grade 2 adenocarcinomákhoz, mind pedig a grade 3 daganatokhoz képest. A pancreasdaganatokon belül a különböző differenciáltságú csoportok között szignifikáns TRIC-mRNS-expresszióbeli különbségeket nem észleltünk, azonban a vizsgált fehérje mRNS-e a grade 3 csoportban a grade 1 és grade 2 daganatokhoz képest, a grade 2 adenocarcinomákban pedig a grade 1 malignomákhoz viszonyítva a tumorok grádusának növekedésével egyértelműen csökkenő tendenciát mutatott.

4.4. „Kimutatható-e TRIC endocrin pancreasdaganatokban, s amennyiben igen, eltérően expresszálják-e a különböző grádusú endocrin tumorok ?”

Az általunk vizsgált neuroendocrin daganatok differenciáltságuktól függetlenül nem mutattak TRIC immunpozitivitást.

4.5. „Detektálható-e a hasnyálmirigy acinussejtes carcinomájában a TRIC?”

A hasnyálmirigy acinussejtes daganataiban kifejezett, pontszerű immunreakciót észleltünk az abortív mirigyszerű struktúrákat képező tumorsejtek apicalis pólusának megfelelően.

4.6. „Jelen van-e normál humán májszövetben a TRIC? Amennyiben igen, észlelhető-e expressziós vagy lokalizációs különbség a májsejtek és az epeutak között?”

Immunfluoreszcencia segítségével a TRIC feltűnő, pontszerű halmozódását tapasztaltuk a tricelluláris találkozási pontokban, míg a két sejt között kialakult junkcióknak megfelelően lineáris membránpozitivitást észleltünk. Az általunk vizsgált normál májszövetekben a TRIC heterogén expresszióját észleltük. A vizsgált ellenanyagok mind a hepatocyták, mind pedig az epeúti háms sejtek felületén kimutathatóak voltak. Kettős immunfluoreszcens vizsgálataink során TRIC-CLDN-1 és TRIC-MRP2 ko-lokalizációt észleltünk normál májban, megerősítve ezzel a TRIC leírt elhelyezkedését a hepatocytákban és a primer epeúti sejtekben. HCC-ban TRIC-CLDN-1 ko-lokalizációt azonosítottuk, intrahepaticus cholangiocarcinomákban pedig TRIC-CLDN-4 kettős jelölődést detektáltunk. A fibrolamellaris HCC-k esetében szintén két sejt között lineáris, három sejt között pedig pontszerű TRIC-expressziót észleltünk. Hasonlóan az immunfluoreszcens vizsgálatok eredményeihez, az elvégzett immunhisztokémiai reakciók alapján is heterogén TRIC-pozitivitást figyeltünk meg. A tricelluláris junkcióknak megfelelően pontszerű, míg a bicelluláris sejtkapcsoló struktúrákat jelző membránok mentén lineáris pozitívítást tapasztaltunk májsejtekben, cholangiocytákban és a nagyobb epevezetékben egyaránt. Eredményeinket Western-blot vizsgálattal is alátámasztottuk.

4.7. „Kimutatható-e TRIC cirrhotikus, nem daganatos májszövetben?”

Az általunk vizsgált cirrhotikus májszövetekben a göbök parenchymájában pontszerű és lineáris immunpozitivitást is azonosítottunk. A kis- és közepes méretű epeutakban túlnyomórészt pontszerű TRIC-jelölődést detektáltunk. Vizsgálataink során nem észleltünk összefüggést a fehérje-expresszió mértéke és a cirrhosis súlyossága között.

4.8. „HCC-ban azonosítható-e a vizsgált molekula?”

TRIC-immunhisztokémiai vizsgálataink eredménye a HCC-csoportban igen széles határok között mozgott. Néhány HCC TRIC-negatívnak bizonyult, míg mások esetében kifejezett overexpressziót észleltünk. A jól és közepesen differenciált daganatok pszeudoglanduláris struktúrájában a normál epeúti hámban észleltekhöz hasonló TRIC-

expressziót figyeltünk meg a daganatsejtek apicalis pólusához közel. A rendezetlen szerkezetű, trabeculákat és sejtfészkeket alkotó daganatsejtek között is lineáris immunreakciót észleltünk. Néhány grade 3 daganat esetében erős immunpozitivitást tapasztaltunk. Az általunk vizsgált HCC-k közül hat esetben a daganatsejtek 1–2%-ában magi pozitivitást is észleltünk, ennek pontos magyarázatához további vizsgálatok szükségesek.

4.9. „Van-e különbség a különböző differenciáltságú HCC-k TRIC expressziójában?”

Nem észleltünk szignifikáns TRIC-expresszióbeli különbséget a normál májszövetben, a cirrhotikus májban és a vizsgált primer májdaganatokban. A HCC-k közel felében a normál májszövet TRIC-expressziójának kétszeresét mértük. Hepato- és cholangiocelluláris vizsgálataink során sem a daganat differenciáltsága, sem a tumor mérete, sem a betegek életkora között nem tapasztaltunk összefüggést.

A májtumorok túlélésének vizsgálatához szintén Kaplan–Meier elemzést alkalmaztunk, mely alapján nem észleltünk összefüggést a tumor kiérettsége, mérete vagy az életkor és a teljes túlélés között, ugyanakkor a TRIC-fehérjét kifejezetten expresszáló HCC-k esetében a túlélési idő szignifikánsan rövidebb volt ($p < 0,05$). Univariációs Cox-regresszió alapján a 'TRIC-high' – csoport kockázati aránya szintén szignifikánsan magasabb volt (3,12; CI: 1,35–7,2; $p < 0,01$). A pancreas ductális adenocarcinomáihoz hasonlóan a cholangiocarcinomák esetében a 'TRIC-high' – csoport túlélése szignifikánsan jobbnak mutatkozott a 'TRIC-low' – csoporthoz képest ($p < 0,05$). Az epeúti daganatok differenciáltságával csökkenő TRIC-expresszió szignifikáns különbségeket eredményezett a túlélésben is ($p < 0,05$).

Western-blot során hepatocelluláris carcinomákban a vizsgált minták mindegyikében, 60 kDa közelében figyeltünk meg fehérjekötődést. A minták kétharmadában egy nagyobb, 80 kDa környéki termék is megfigyelhető volt. Epeúti tumorokat vizsgálva a minták egyharmadában, a jól differenciált daganatokban kimutattuk a fehérjét; hasonlóan a HCC-csoporthoz. A cholangiocarcinomák esetében is észlehető volt egy nagyobb, 80 kDa körüli fehérjetermék, emellett az epeúti tumorokban 50 kDa közelében is specifikus terméket azonosítottunk.

Májdaganatok esetében a legmagasabb TRIC-mRNS-expressziót a konvencionális HCC-csoportban észleltük; mRNS-expressziós vizsgálataink alapján legkevésbé a FLHCC termelte a vizsgált mRNS-t. Szignifikáns különbségeket nem tapasztaltunk.

4.10. „Előfordul-e a vizsgálni kívánt protein fibrolamellaris HCC-ben?”

A klasszikus HCC-csoporthoz hasonlóan a daganatfészkeket alkotó tumorsejtek apicalis pólusán döntően lineáris membránpozitivitást észleltünk. Első, FLHCC-val kapcsolatos vizsgálatunk során a normál májszövetben szignifikánsan magasabb TRIC-protein expressziót észleltünk, mint az iCC-k, a HCC-k, vagy a FLHCC-k esetében; az iCC-k pedig szignifikánsan kevésbé termelték a vizsgált fehérjét a konvencionális HCC-csoporthoz képest. Kutatásunk folytatása során nagyobb esetszámon is megismételtük a vizsgálatot és így nem mutatkozott szignifikáns különbség a normál és a daganatos minták TRIC-expressziója között, mely feltehetően a bővített esetszámból következő pontosabb statisztikai eredményből adódik. Az iCC-csoportban a daganatok dedifferenciációjával a TRIC-fehérje expressziója szignifikánsan csökkent, hasonlóan a pancreas ductalis adenocarcinomáival kapcsolatos vizsgálatok során észleltekhöz.

4.11. „Észlelhető-e a TRIC-fehérje termelődése cholangiocellularis carcinomában, illetve van-e expressziós különbség az eltérő differenciáltságú adenocarcinomák között?”

A cholangiocarcinomákat vizsgálva a TRIC expressziójának egyértelmű csökkenését azonosítottuk a daganatok dedifferenciálódásával párhuzamosan. A grade 3 tumorok gyenge immunpozitivitást mutattak, míg a jól differenciált daganatok glanduláris részében a normál epeutakban észleltekhöz hasonló, erőteljes, pontszerű TRIC-pozitivitást tapasztaltunk. A HCC-k mirigyeket nem képző típusaiban igen gyenge jelet vagy a fehérje hiányát észleltük. Részben eltérő eredményeket kaptunk az intrahepatikus cholangiocarcinomák elemzésekor: ebben a vizsgálati csoportban a HCC-hoz képest szignifikánsan csökkent TRIC-expressziót detektáltunk.

Digitális morfometriai elemzéseink szerint a TRIC-pozitív területek százalékanak átlagértékét véve alapul, a hepato- és cholangiocelluláris daganatok 'TRIC-high' és 'TRIC-low' profillal rendelkeznek. Az elvégzett Spearman-féle rangkorreláció alapján a daganat differenciáltsága, mérete és a betegek életkora független tényezőnek tekinthető.

5. KÖVETKEZTETÉSEK

1. A TRIC-protein az exocrin pancreasban mind az acinusok, mind a ductalis rendszer hámsejtjeiben kimutatható volt. Az exocrin pancreas ductalis és acinaris rendszerében észlelt TRIC-expresszió intenzitásában és lokalizációjában nem észleltünk különbséget. Az endocrin hasnyálmirigyszövetekben a TRIC-protein vizsgálataink alapján nem expresszálódott.
2. Fehérjeszintű és mRNS-expressziós vizsgálataink alapján a TRIC mind fehérje-, mind mRNS-szinten kimutatható pancreas ductalis eredetű adenocarcinomákban.
3. Fehérjeszintű vizsgálataink eredményei szerint a normál pancreashoz képest a grade növekedésével, a daganatok dedifferenciálódásával párhuzamosan a ductalis adenocarcinómák TRIC-expressziója szignifikánsan alacsonyabb. Molekuláris vizsgálataink szerint normál pancreasban szignifikánsan magasabb TRIC-mRNS-expresszió észlelhető mindhárom differenciáltságú daganattípushoz képest.
4. A TRIC endocrin hasnyálmirigy-daganatokban differenciáltságtól függetlenül sem fehérje-, sem mRNS-szinten nem volt kimutatható.
5. A pancreas acinussejtes carcinomáiban kifejezett, pontszerű immunreakciót észleltünk a tumorosan transzformált, mirigyszerű struktúrákat alkotó daganatsejtek apicalis pólusának megfelelően.
6. A normál májszövetben heterogén TRIC-expressziót észleltünk: a vizsgált fehérje a hepatocyták és az epeúti hámsejtek felületén is kimutatható volt. A TRIC fehérje lokalizációban volt kimutatható CLDN-1-gyel és MRP2-vel, alátámasztva ezzel a TRIC apicalis elhelyezkedését a primer máj- és epeúti sejtekben.
7. A vizsgált macro- és micronodularis cirrhotikus májszövetben is sikerült TRIC fehérjét detektálni. Expressziós mintázatát illetően hasonló eredményre jutottunk a normál májszövetekben azonosítottakhoz képest. Intranodularisan pontszerű és lineáris immunpozitivitást is észleltünk. Érdemi expresszióbeli különbséget nem igazoltunk a normál májszövet TRIC-kifejeződéséhez képest. Eredményeink szerint nem áll fenn összefüggés a fehérje-expresszió mértéke és a cirrhosis súlyossága között.

- 8.** A TRIC fehérjeszinten kimutatható a különböző differenciáltságú hepatocellularis carcinomákban, az expresszió mértéke azonban igen széles határok között mozog.
- 9.** A grade 1 és grade 2 tumorok TRIC-expressziója hasonlóan mutatkozott a normál epeúti hámban detektáltakhoz képest. A grade 3 daganatok rendezetlen sejtfészkeiben csak lineáris membránpozitivitást azonosítottunk, néhány rosszul differenciált daganat erős immunpozitivitást mutatott. Az általunk vizsgált HCC-k közül hat esetben a daganatsejtek 1–2%-ában magi pozitivitást is észleltünk, ennek pontos magyarázatához további vizsgálatok szükségesek. Hepato- és cholangiocelluláris vizsgálataink során sem a daganat differenciáltsága, sem a tumor mérete, sem a betegek életkora között nem tapasztaltunk összefüggést. A TRIC-fehérjét kifejezetten expresszáló HCC-k esetében a túlélési idő szignifikánsan rövidebb volt.
- 10.** Igazoltuk a TRIC fehérje jelenlétét FLHCC-ben, perimembranosus lokalizációban. A protein szignifikánsan magasabban expresszálódott normál májszövetben a FLHCC-hoz képest.
- 11.** Az általunk vizsgált cholangiocarcinomákban a TRIC-fehérje kimutatható volt a daganatosan transzformált sejtek felszínén pontszerű és lineáris elhelyezkedésben egyaránt.
- 12.** Az intrahepatikus CC-csoportot vizsgálva szignifikáns TRIC-expresszió csökkenést észleltünk a daganatok dedifferenciálódásával párhuzamosan. A cholangiocelluláris daganatok esetén, szemben a HCC-csoporttal, egyben a pancreas ductalis adenocarcinomáihoz hasonlóan, a TRIC-t kifejezetten expresszáló csoport túlélése szignifikánsan jobbnak mutatkozott.

6. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A dolgozat témájában közölt publikációk:

Korompay A, Borka K, Lotz G, Somorác A, Törzsök P, Erdélyi-Belle B, Kenessey I, Baranyai Z, Zsoldos F, Kupcsulik P, Bodoky G, Schaff Z, Kiss A. Tricellulin expression in normal and neoplastic human pancreas. *HISTOPATHOLOGY*. 60:(6B) pp. 76-86. (2012) **IF: 2.857**

Somorác A, **Korompay A**, Törzsök P, Patonai A, Erdélyi-Belle B, Lotz G, Schaff Z, Kiss A. Tricellulin expression and its prognostic significance in primary liver carcinomas. *PATHOLOGY & ONCOLOGY RESEARCH*.20:(4) pp. 755-64. (2014) (**IF: 1.855**)

Patonai A, Erdélyi-Belle B, **Korompay A**, Somorác A, Törzsök P, Kovalszky I, Barbai T, Rásó E, Lotz G, Schaff Z, Kiss A. Molecular characteristics of fibrolamellar hepatocellular carcinoma. *PATHOLOGY & ONCOLOGY RESEARCH*. 19:(1): pp. 63-70.(2013)**IF: 1.806**

Patonai A, Erdélyi-Belle B, **Korompay A**, Somorác A, Straub BK, Schirmacher P, Kovalszky I, Lotz G, Kiss A, Schaff Z. Claudins and tricellulin in fibrolamellar hepatocellular carcinoma. *VIRCHOWS ARCHIV*. 458:(6) pp. 679-88. (2011)**IF: 2.491**

A doktori munka témájától független publikációk:

Pallagi P, Venglovecz V, Rakonczay Z Jr, Borka K, **KorompayA**, Ozsvári B, Judák L, Sahin-Tóth M, Geisz A, Schnúr A, Maléth J, Takács T, Gray MA, Argent BE, Mayerle J, Lerch MM, Wittmann T, Hegyi P. Trypsin reduces pancreatic ductal bicarbonate secretion by inhibiting CFTR Cl⁻channels and luminal anion exchangers. *GASTROENTEROLOGY*. 141:(6) pp. 2228-2239. (2011) **IF: 11.675**

Székely E, Törzsök P, Riesz P, **KorompayA**, Fintha A, Székely T, Lotz G, Nyirády P, Romics I, Tímár J, Schaff Z, Kiss A. Expression of claudins and their prognostic significance

in noninvasive urothelial neoplasms of the human urinary bladder. *JOURNAL OF HISTOCHEMISTRY & CYTOCHEMISTRY*. 59:(10) pp. 932-41. (2011) **IF: 2.725**

Kemény LV, Hegyi P, Rakonczay Z Jr, Borka K, **KorompayA**, Gray MA, Argent BE, Venglovecz V. Substance P inhibits pancreatic ductal bicarbonate secretion via neurokinin receptors 2 and 3 in the guineapig exocrine pancreas. *PANCREAS*. 40:(5) pp. 793-795. (2011) **IF: 2.386**

A doktori munka témájától független magyar nyelvű publikációk:

Székely B, Langmár Z, Somlai K, Szentmártoni G, Szalay K, **KorompayA**, Szász AM, Kulka J, Bánhidly F, Dank M. A várandósság alatti emlőrák kezelése. *ORVOSI HETILAP*. 151:(32) pp. 1299-1303. (2010)

Székely B, Madaras L, Szentmártoni G, Szász AM, Baranyák Z, Szittyá L, Torgyík L, Zergényi E, Borbényi E, Kenessey I, **KorompayA**, Langmár Z, Bánhidly F, Kulka J, Dank M. A fiatal- és időskori emlőrák összehasonlítása klinikopatológiai jellemzők alapján. *MAGYAR ONKOLÓGIA*. 54:(1) pp. 19-26. (2010)

Kulka J, Tőkés AM, Tóth AI, Szász AM, Farkas A, Borka K, Járay B, Székely E, Istók R, Lotz G, Madaras L, **Korompay A**, Harsányi L, László Z, Rusz Z, Molnár BA, Molnár IA, Kenessey I, Szentmártoni G, Székely B, Dank M. Az emlődaganatok primer szisztémás kemoterápiára adott válasza az immunhisztokémiai fenotípus tükrében. *MAGYAR ONKOLÓGIA*.53:(4) pp. 335-343. (2009).